

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hidenobu SENPUKU, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: METHOD FOR EXAMINING THE CARIES RISK

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS  
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.

☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed

☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY

Japan

APPLICATION NUMBER

2002-352466

MONTH/DAY/YEAR

December 4, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

☒ are submitted herewith

☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

☐ were filed in prior application Serial No. filed

☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number

Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and

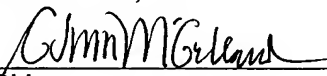
☐ (B) Application Serial No.(s)

☐ are submitted herewith

☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

  
Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 05/03)

C. Irvin McClelland  
Registration Number 21,124

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

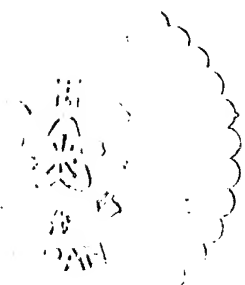
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 2 月    4 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 3 5 2 4 6 6  
Application Number:

[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 3 5 2 4 6 6 ]

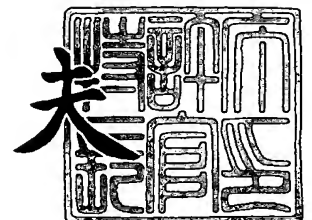
出      願      人                      株式会社ジーシー  
Applicant(s):



2 0 0 3 年    7 月 2 5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 9 4 3 7

【書類名】 特許願

【整理番号】 GCD1629

【提出日】 平成14年12月 4日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 A61B 5/00  
C07K 16/12

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区富岡西 6 - 3 7 - 5

【氏名】 泉福 英信

【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区蓮沼町 7 6 番 1 号 株式会社ジーシー内

【氏名】 鱒沢 諭美子

【特許出願人】

【識別番号】 000181217

【氏名又は名称】 株式会社ジーシー

【代理人】

【識別番号】 100070105

【弁理士】

【氏名又は名称】 野間 忠之

【電話番号】 03-3214-2861

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000273

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9707600

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 う蝕リスク検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HLA遺伝子群のクラスII型におけるDRB1\*の遺伝子型を同定することによりう蝕のリスクを検査することを特徴とするう蝕リスク検査方法。

【請求項2】 HLA遺伝子群のクラスII型におけるDRB1\*の遺伝子型を同定し、予め確認してある、下記の式から成るアミノ酸配列の合成タンパクを抗原とした場合に該抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリンAの抗体価の大小から導き出されたう蝕リスクの高低と比較する請求項1に記載のう蝕リスク検査方法。

【式1】

Asn Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala  
Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトの遺伝子診断を利用してう蝕のリスクを判定する方法に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】

ヒトの口腔内に存在するミュータンス連鎖球菌の存在とう蝕の発生との間には密接な関係があることが知られており、例えば、Anders Thylstrup and Ole Fejerskov, "Textbook of clinical cariology" (Denmark), Munksgaard社, 1996, 2nd edition, p.405 など多くの研究が報告されている。ミュータンス連鎖球菌はヒトの唾液中に存在する菌種ではストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス（以後、それぞれS.mutans及びS.sobrinusと記す）の総称である。

【0003】

唾液中に存在するミュータンス連鎖球菌の量が多いほど将来新たなう蝕が多く生じることから、唾液中のミュータンス連鎖球菌を簡易に定量する試みが数多く行われてきた。例えばS.mutansに特異的に反応するモノクローナル抗体を応用して定量しようとするものとして、特開平2-177898号公報や特開平10-36400号公報で提案されている方法が、また簡易培養キットで増殖した菌体そのものを目視により定量するものとして米国特許5374538号公報で提案されている方法がある。しかし、唾液中のミュータンス連鎖球菌の量を測定することでう蝕のリスクを検査するには実際に口腔内にミュータンス連鎖球菌が存在することが必要であり、う蝕のリスクが高いと判断された時には既にう蝕になってしまっていることが多いという欠点があった。

#### 【0004】

一方、人によってミュータンス連鎖球菌の量の増加の仕方が異なっていることが解っており、この増加の仕方の差を予め知ることが可能となればミュータンス連鎖球菌の実際の増加や量と関係なくう蝕のリスクを知ることが可能となる。そこで、ミュータンス連鎖球菌の量を菌に感染する前にも測定できるう蝕リスクの検査方法として、特定の感染症に罹患しているか否かを判定するために用いる体内の特定の感染源に起因する抗体を調べることによる方法が注目されてきた。

#### 【0005】

ミュータンス連鎖球菌の一種であるS.mutansの菌体表層物質の中で、分子量約19万のPac (Protein Antigen cerotype C) と呼ばれるタンパク質抗原がミュータンス連鎖球菌の歯面への初期付着に関連があることがそれを抗原としたモノクローナル抗体を利用した研究から確認された。そして、Pacの中で純粋にミュータンス連鎖球菌の歯面への初期付着に関連がある部分を特定する研究が進められ、Takahashi I. et al. "Immunogenicity and protective effect against oral colonization by Streptococcus mutans of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen", J. Immunol, (USA), 1991, 146, p.332-6 や、Takahashi I. Infect Immun (USA), Baltimore Md. American Association of Immunologists, 1992, 60, p.623-629や、Okahashi N. et al. Mol. Microbiol. (USA), Blackwell Scientific Publications, 1993, 3, p.221-228などによ

り、Pac中の $\alpha$ 螺旋構造を持つA領域（アミノ酸配列：216-464の部分）がS.mutansによる歯面上のコロニー化と接着に強い影響があることが確認され、更に進んでこのPacのA領域の中でより重要な配列が何であるかに関してを本発明者の一人である泉福等が解明したのである（例えば、非特許文献1参照）。その後、PacのA領域の中で抗原としてヒトの免疫系に強く作用する配列は、Y---L--Y（ヒトのB細胞エピトープ）、及びL--V-K--A（ヒトの様々なHLA-DR分子と反応する部位）であることが確認され（例えば、非特許文献2, 3参照）、この結果から、Pacの以下の特定アミノ酸配列〔NAKATYEAALKQYEADLA AVKKANAA（Pac（361-386））〕が導き出された。その詳細は下式の通りである。

【式2】

Asn Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala  
Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala

【0006】

その結果、本発明者等はアミノ酸配列としてPac（361-386）を抗原とし、ミュータンス連鎖球菌の歯面への付着を防ぐ機能となっている口腔粘膜から分泌される分泌型免疫グロブリン抗体A（sIgA）の抗体価を測定すれば、う触リスクの検査が正確に行えることを究明した。

【0007】

しかし、唾液に分泌されるPac（361-386）に対する分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価を測定することは、免疫機能が完成されていない6歳程度までの乳幼児では検査することができず、また個人の唾液の分泌量の違いから唾液の量が多いヒトと少ないヒトでは測定する分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価を正確に反映することができなかった。更に、唾液分泌量が極度に少ない口腔乾燥症の患者や唾液の分泌が衰えた老人等にも対応できない欠点があった。

【0008】

【非特許文献1】

Senpuku H, et al. "An antigenic peptide inducing cross-reacting antibodies inhibiting the interaction of Streptococcus mutans Pac with human salivary components" Infect Immun (USA), Baltimore Md. American

Associaton of Immunologists, 1995, 63 p.4695-4703

【非特許文献 2】

Senpuku et al. "Identification of Streptococcus mutans PAc peptide motif binding with human MHC class II molecules (DRB1\*0802, \*1101, \*1401 and \*1405)" Immunology(England), Blackwell Scientific Publications, 1998, 95, p.322-330

【非特許文献 3】

Senpuku et al. "Inhibitory Effects of MoAbs against a Surface Protein Antigen in Real-Time Adherence In vitro and Recolonization In vivo of Streptococcus mutans" Scand. J. Immunol. (England), Oxford Blackwell Scientific Publications, 2001, 54, p.109-116

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明は、年齢、唾液量に関係なく全ての人を検体対象とできるう蝕リスク検査方法を提供することを課題とする。

【0 0 1 0】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は前記課題を解決すべく鋭意検討をした結果、年齢、唾液量に関係無くう蝕リスクを検査するために主要組織適合性遺伝子複合体（以下単にMHCと言うことがある）に着目した。MHCは全ての高等脊椎動物の細胞で発現されているが、ヒトでは白血球で最初に実証されたのでヒト白血球付随抗原（human histocompatibility leukocyte antigen）又はヒト白血球抗原（human leukocyte antigen）と呼ばれている（以下単にHLAと呼ぶことがある）。このHLA遺伝子群は、免疫系に非常に重要な役割があり、非自己を認識する抗原として機能していることが知られている。

【0 0 1 1】

前述のPAc（361-386）に対する抗体を分泌させる機構は、もちろん免疫系遺伝子に関連しているため、唾液中に分泌される分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価の違いはヒトの分泌型免疫グロブリン抗体Aの分泌に関連する特定の遺伝子型

により決定されている。従って、個人の遺伝子型を特定することによるう蝕のリスク検査は可能であり、う蝕のリスクの高低、つまりは唾液中に分泌される分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価の大小によるヒトの遺伝子型を予め特定しておけば、遺伝子を同定するだけで全てのヒトを対象可能なう蝕リスク検査方法とすることが可能であることを究明して本発明を完成したのである。

### 【0012】

#### 【発明の実施の形態】

即ち本発明は、HLA遺伝子群のクラスII型におけるDR座のDRB1\*の遺伝子型を同定することによりう蝕のリスクを検査することを特徴とするう蝕リスク検査方法であり、より詳しくはHLA遺伝子群のクラスII型におけるDRB1\*の遺伝子型を同定し、予め確認してある、下記の式から成るアミノ酸配列の合成タンパクを抗原とした場合に該抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリンAの抗体価の大小から導き出されたう蝕リスクの高低と比較するう蝕リスク検査方法である。

#### 【式3】

Asn Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala  
Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala

### 【0013】

HLA遺伝子群にはクラスI型とクラスII型とがあり、全体の分子構造は酷似している。両者とも、膜貫通型のヘテロ二量体で細胞外に出たアミノ酸末端ドメインにT細胞に提示する抗原が結合する。クラスII型はB細胞や抗原提示細胞等の限られた細胞に存在し、T細胞を通じてB細胞による抗体産生を促進する機構等がある。本発明では特にHLA遺伝子群のクラスII型の遺伝子群を利用するのである。クラスII型のHLAは、HLA-DR, DQ, DP等の種類があることが知られており、更に $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の4つのドメインから構成されている。HLAは第6染色体短腕上のHLA遺伝子により規定されており、高度の多型性がある。特にクラスII型のDR遺伝子の $\beta$ 鎖(DRB1, DRB3, DRB4, DRB5)はより多型性に富むことが知られており、近年、各種疾病とこれらの多型性遺伝子型とに相関があることが知られている。



## 【0014】

本発明に係るう蝕リスク検査方法は、先ず被験者の細胞を採取し、そのDNAを抽出して第6染色体短腕上のHLA遺伝子群を特定する。特定されたHLA遺伝子群と予め調査により作製されたPAC (361-386) に対する唾液中に分泌される分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価の高かった（又は低かった）HLA遺伝子群との比較によりう蝕リスクを評価するのである。

## 【0015】

HLA遺伝子群はヒトの全ての細胞に存在するため、サンプルとしてはヒトのどの部位の細胞を用いてもよい。その中でも歯科医の診療室で簡便にう蝕リスクを調べるためには、最も採取し易いサンプルであるヒトの口腔粘膜細胞を用いることが好ましい。口腔粘膜細胞の採取はスプーンで搔くなどの方法で採取すればよい。

## 【0016】

採取した細胞からのDNAの抽出方法としては、動物細胞からDNAを抽出する一般的な方法が使用可能である。例えば、フェノールクロロホルム法が好ましく各種市販のキットを利用できる。

## 【0017】

遺伝子型の特定方法としては、PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) や、PCR-SSO (polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide)、PCR-SSP (polymerase chain reaction-sequence specific priming) 等が利用できる。しかし、本発明に係るう蝕リスク検査方法で用いられる遺伝子の特定法は、上記以外にも適切な方法があれば何れも使用可能である。

## 【0018】

特定されたHLA遺伝子群と予め調査により作製されたPAC (361-386) に対する唾液中に分泌される分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価の高かった（又は低かった）HLA遺伝子群との比較によりう蝕リスクを評価する。例えば、現在確認されている遺伝子型において、う蝕リスクが高い、即ち、分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価が低い遺伝子型としては、DRB1\*0101、DRB1\*0405、DRB1\*0803

、DRB1\*1302、DRB1\*1502、DRB1\*0410を二量体の一方に持つ場合が、またう蝕リスクが低い、即ち、分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価が高い遺伝子型としては、DRB1\*0403、DRB1\*0406、DRB1\*0401、DRB1\*0802、DRB1\*0901、DRB1\*1202、DRB1\*1401、DRB1\*1405、DRB1\*1501、DRB1\*1602を二量体の一方に持つ場合が確認されている。なお、今後の研究によって全ての二量体の組合せが解明されれば、より正確な評価で行うことができるようになる。

#### 【0019】

本発明に利用するPAc(361-386)を得るためには、このアミノ酸配列を得ることができる手法であれば特に限定されないが、一般的にはアミノ酸シンセサイザーを用いるのが便利である。

#### 【0020】

本発明に係るう蝕リスク検査方法で利用する分泌型免疫グロブリン抗体Aの抗体価の測定方法は、ミュータンス連鎖球菌に対する抗体価測定法の一つである酵素抗体法 (Enzyme Linked immunosorbent Assay ; 以下E L I S Aと記す) を用いても十分実用可能な感度が得られるが、抗原抗体反応で得られる測定値の感度向上のために一般的に用いられる技術、例えば、唾液中の分泌型免疫グロブリンAを一旦ビオチン化抗ヒト免疫グロブリンなどと反応させ定量時の測定感度を増すこともでき、一般的な抗原抗体反応に基づく手法がそのまま応用できる。その他に、イムノクロマト、イムノコンセントレーション、ラテックス凝集法などがいずれも好適に使用できる。

#### 【0021】

##### 【実施例】

以下、本発明に係るう蝕リスク検査方法の実施例を示し具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。なお、特に記述がない限り操作は室温で行い、pHは20～25℃における値を示す。タンパク量は280nmの吸光度からその濃度を算出した。

#### 【0022】

##### <実施例1>

##### <細胞の採取方法>

スワブ（製品名：C.E.P. スワブ，ライフテックオリエンタル株式会社製）を使って口腔内の頬の一部を擦って口腔粘膜細胞を採取した。採取後直ぐにDNAの抽出作業を行った。

#### 【0023】

##### <口腔粘膜細胞からのDNA抽出>

採取した口腔粘膜細胞は、500  $\mu$ LのDNAzol試薬（ライフテックオリエンタル株式会社製）が添加してある1.5 mLチューブに添加した後、ホモジナイズしてエタノール沈澱・洗浄を行い、DNAを抽出した。吸光度O. D. 260 nmでDNA濃度を、O. D. 260 nm/O. D. 280 nmで抽出純度を確認した。抽出したDNAはTEバッファー〔トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン：10 mM，エチレンジアミン四酢酸(EDTA)：1 mM，pH 8.0〕に懸濁し、以下の操作を行った。

#### 【0024】

##### <DRB1\*遺伝子型の決定>

Trejaut J. et al. の“PCR-RFLP typing detects new HLA-DRB1 alleles : DRB1\*13022, DRB1\*1336 and DRB1\*1435” (European Journal of Immunogenetics, 28, 441-447) に順じて以下のPCR-RFLPを用いて行った。PCRの条件は以下の通りである。

上記精製DNA	: 100~500 ng
MgCl <sub>2</sub>	: 1.5 mM
dNTPs	: 40 $\mu$ M
ジメチルスルホキシド (DMSO)	: 3 重量%
下記のプライマー	: 50 pM

Amp l i T a q (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) : 1 unit

上記全てを混和し、合計50  $\mu$ Lに調整した。

#### 【0025】

プライマーには、

DR3 (5'cacgtttcttgagtagctc 3') (Horne & Keown, 1993)

Amp B (5'ccgctgcactgtgaagctct 3') (Kimura & Sasazuki, 1992)

をDRB1\*03, 08, 11, 12, 13, 14に用いた。増幅後はエクソン2から266bpの増幅断片を得ることができる。なお、DRB1\*1122, 1410に関しては、5'側のプライマーDR3に代えてDR4-likeを使用し、同様にDRB1\*1130にはDR4-likeを使用した(Marsh, S.G.E., HLA class II region sequence 1998, Tissue Antigen: 51, 467-507参照)。

#### 【0026】

調整したサンプルをサーマルサイクラー(商品名: GeneAmp PCR System 9700 サーマルサイクラー, PE Biosystems社製)を用いて特定遺伝子配列を増幅させた。サーマルサイクラーのプログラムは、95℃で2分の後、94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で30秒を30回繰り返し行い、その後、72℃で10分の操作を行った。この増幅配列の確認には、上記PCR産物5μLを2%、1×TAE(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン: 0.04M、アセテート: 0.04M、EDTA: 0.001M)に0.2μg/mLのエチレンブロマイドを含むアガロースゲルを電気泳動装置(製品名: ミューピッド2, コスモバイオ社製)を用いて電気泳動させた。電気泳動産物はUV-トランスイルミネーター(フナコシ製)を用いて増幅産物を確認した。

#### 【0027】

##### <制限酵素処理>

電気泳動後、制限酵素処理を行った。即ち、BseRI(4unit), BsaJI(3unit), RsaI(5unit), Sau96I(5unit)(全て、New England Biolabs社製)を用いた。制限酵素処理は、PCR産物10μLに1×緩衝液(酵素と一緒に提供されている)を用いて上記酵素、精製水を使用して37℃で一晩処理した。但し、BsaJIのみ、60℃一晩の処理で行った。前記制限処理サンプルは1×TBE(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン: 0.089M、ホウ素: 0.089M、EDTA: 0.02M)で調整した10%ポリアクリルアミドゲルを用いて500Vで1時間の条件で電気泳動を行った。電気泳動にはサイズマーカーとして、100bp DNA(宝酒造社製)を1レーンに流し、電気泳動産物の確認に使用した。電気泳動後、ゲルをガラス版から外し、0.8μg/mLエチジウムブロマイドを1×TBEに溶解したものに数時間浸漬することで染色した。ゲルの確認はU

V-トランスイルミネーター（フナコシ社製）とゲル撮影機（商品名：フナロイドカメラFR6000, フナコシ社製）を用いて写真を撮影し確認した。

#### 【0028】

##### <DRB1配列の決定>

DRB1遺伝子型の決定は前述の方法に順じた。

#### 【0029】

##### <ELISAによる唾液分泌抗体の測定>

##### (1) PAc(361-386)の合成

PAc(361-386)のアミノ酸配列を持つペプチドをステップワイスの固相ペプチド合成法から得た。合成器には、Model 350 Multiple Peptide Synthesizer（製品名：Advanced Chemitech, Louisville社製）を使用し、TSK-GELカラム（30×1）を用いた逆相の高速液体クロマトグラフィー法（10～45%アセトニトリルをカラムとし、グラジエントに0.1%TFAを使用）にて合成ペプチドの確認を行った。最終精製度は95%以上であった。

#### 【0030】

##### (2) 唾液分泌抗体の測定

##### A) 抗体の固相化

前記の方法で合成したPAc（361-386）を50mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH9.6）で希釈し、96穴マイクロプレート（Sumitomo Bakelite社製）の各wellに100μLになるように添加した。これを4℃で一晩静置しPAc（361-386）とwellとを結合させた。

#### 【0031】

##### B) ブロッキング

前記の方法で固相化したマイクロプレートをマイクロプレートウォッシャー（製品名：Model 1575, バイオラット社製）を用いPBS（Phosphate buffered saline pH7.4）に0.1重量%の中性界面活性剤（商品名：TWEEN 20, SIGMA社製）を含有させた液（以下、PBSTと言う）にて3回洗浄を行う。洗浄後、1%スキムミルク含有PBSをwell当たり200μL注入し1時間37℃でブロッキングを行った。ブロッキング後、PBSTで3回洗浄し、余計なブロッ

キング剤を洗浄した。

### 【0032】

#### C) 唾液の調整

パラフィンワックスを3分間噛むことにより分泌される刺激唾液を検体とした。唾液検体は回収後、測定開始まで氷中保存した。実験には、唾液を0.5%スキムミルク含有PBSTで2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024倍に希釈したものを作製し、上記のプレートに各100 $\mu$ L添加した。添加後、37℃で1時間静置した後、PBSTで洗浄した。

### 【0033】

#### D) 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識された抗ヒトIgA抗体(商品名: Anti-Human-IgA, Chemicon International社製)を0.5重量%スキムミルク含有PBSTにて0.3 $\mu$ g/mLに調整し、各wellに100 $\mu$ L添加し、1時間37℃で反応させた。

### 【0034】

#### E) 発色

PBSTにて洗浄後、アルカリフォスファターゼの発色基質であるp-ニトロフェノールリン酸二ナトリウム6水和物0.1重量%含有ジエタノールアミンバッファーを各wellに100 $\mu$ L添加し、37℃で30分間静置した後、波長405nmの吸光度を測定した。結果を表1に示す。なお、ジエタノールアミンバッファーは以下の処方で調整した。

ジエタノールアミン	48.5mL
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	50.0mg
Na <sub>3</sub> N	100mg
H <sub>2</sub> O	400mL

最終pH9.8に調整後、水を加えて500mLとした。

### 【0035】

5人の被験者(A, B, C, D, E)の唾液中の免疫グロブリンAのPac(361-386)に対する抗体価をELISAで計測し、その結果を図1に示した。その結果

、抗体価が高いグループ（この場合はA，C，E）と低いグループ（この場合はB，D）の2つのグループに分けた。なお、口腔内の実際のミュータンス連鎖球菌の量と抗体価の高低によるグループ間においてう触リスク検査方法の精度は確認されている。

### 【0036】

前述の被験者（A，B，C，D，E）の口腔粘膜細胞から前述の方法により各人のHLA-DRB1\*遺伝子型を同定し、唾液中の分泌型免疫グロブリンAのPAc(361-386)に対する抗体価との関係を確認しておく。その結果を表1に示す。このような条件の設定により予め複数の被験者をサンプルとして前述の抗体価が高いグループ（A，C，E）と低いグループ（B，D）の2つのグループにそれぞれに対応する遺伝子型を確認しておく。なお、HLA-DRB1\*遺伝子型と抗体価に相関があることは確認されている。

### 【0037】

【表1】

抗体価 (O.D. 405nm)	被験者	HLA遺伝子群のクラスII型における DRB1*の遺伝子型
高	A	0403, 0405
	C	1501, 0410
	E	1602, 1405
低	B	0101, 1502
	D	0803, 0803

### 【0038】

実際のう触リスクの検査方法は、前述のように予め確認してあるPAc(361-386)を抗原とした場合にその抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリンAの抗体価の大小から導き出されたいう触リスクの高低に関する遺伝子型と、被験者から同定された遺伝子型を比較しう触リスクを導き出すのである。

### 【0039】

### 【発明の効果】

以上に詳述したように本発明に係るう蝕リスク検査方法は、遺伝子から診断できるため従来の免疫的な方法と比較して年齢、唾液量に関係なく全ての人を検体対象とできるう蝕リスク検査方法であり、本発明方法によりう蝕リスクの診断がより広く正確に行うことが可能であるため歯科医療に貢献する価値は非常に大なるものである。

**【図面の簡単な説明】**

**【図 1】**

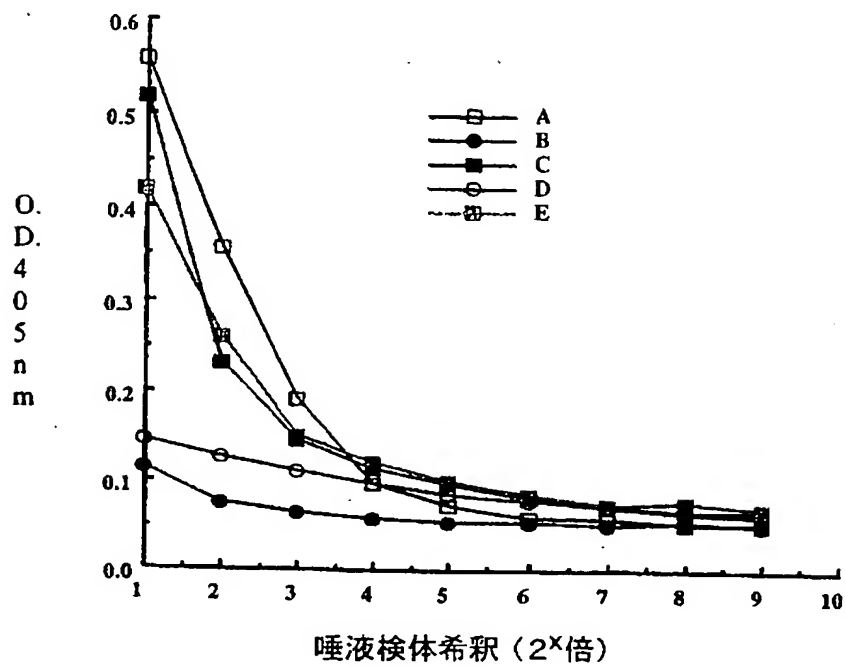
5 人の被験者（A，B，C，D，E）の唾液中の免疫グロブリン A の PAc(361-386)に対する抗体価を E L I S A で計測した結果を示す図である。



【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 年齢、唾液量に関係なく全ての人を検体対象とできるう蝕リスク検査方法を提供する。

【既決手段】 H L A 遺伝子群のクラスII型における D R B 1 \* の遺伝子型を同定し、予め確認してある、下記の式から成るアミノ酸配列の合成タンパクを抗原とした場合に該抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリンAの抗体価の大小から導き出されたう蝕リスクの高低に関わる遺伝子型と比較してう蝕のリスクを検査する。

【式1】

Asn Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala  
Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 5 2 4 6 6

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 8 1 2 1 7 ]

1. 変更年月日            1 9 9 0 年    8 月 2 3 日  
    [変更理由]        新規登録  
        住 所        東京都板橋区蓮沼町 7 6 番 1 号  
        氏 名        而至齒科工業株式会社
  
2. 変更年月日            1 9 9 1 年    6 月 1 2 日  
    [変更理由]        名称変更  
        住 所        東京都板橋区蓮沼町 7 6 番 1 号  
        氏 名        株式会社ジーシー